Efecto de auxina y citokinina en la regeneración de vástagos a partir de cotiledones de *Cucumis melo* L. var. Edisto

Carle Valecillos*, María Vielma*, Argenis Mora** y Melangel Tacoronte*

Universidad de Los Andes, *Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Laboratorio de Cultivos *in vitro*, **Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Mérida-Venezuela.

Recibido 10-02-2000, Aceptado 15-03-2000

Resumen

Para la transformación genética de ***Cucumis melo*** **L.** (melón) mediada por ***Agrobacterium tumefaciens***, es necesario optimizar condiciones de propagación *in vitro* y de transformación. La formación de primordios de vástagos a partir de segmentos de cotiledón es de bajo rendimiento. En este trabajo se estudió el efecto de las relaciones de AIA/BA determinadas, aplicando el diseño estadístico Compuesto Central Rotable (CCR) para generar una superficie de respuesta y determinar una relación óptima en la formación de primordios de vástagos.

Los segmentos de cotiledón fueron cultivados en el medio MS modificado e incubados a 25 °C y 16 horas luz. El mayor porcentaje de formación de primordios de vástagos (87,5 %) fue obtenido en la relación 4,7/7,5 mM de AIA/BA. La maximización de la respuesta se obtuvo a 5,7 mM (65 %) de BA con respecto a la concentración de 4,4 mM BA. Los porcentajes más bajos de formación de primordios de vástagos se presentaron a concentraciones de 7,5/8,8 mM AIA/BA. La mayor formación de callo (100 %) se obtuvo en las relaciones 7,5/8,8 mM de AIA/BA. La respuesta de expansión del explante fue obtenida en casi todos los tratamientos entre 75-100 %. Sin embargo, en *C. melo* L var. Edisto, las relaciones de BA cercanas a 4,4 mM, promueven la formación de vástagos a partir de segmentos de cotiledón.

Palabras clave: Ácido Indol Acético, AIA; Beciladenina, BA, melón, Regeneración, Cultivos *in vitro*.

Abstract

In order to obtain genetic transformation on ***Cucumis melo*** **L.** (melon) mediated by ***Agrobacterium tumefaciens***, it is necessary to optimise *in vitro* propagation and transformation conditions. Shoot primordial formation from cotyledon segments is low yield. In this work the relationship IAA/BA effect was studied, applying a statistic design named Rotary Central Compound (RCC), which generates a response surface and determines a good relationship on shoot primordial formation. Cotyledon segments were cultivated on MS modified medium and incubated at 25 °C and 16 hours light. The greatest percentage on shoot primordial formation (87,5 %) was obtained on medium containing IAA/BA 4,7/7,5 mM. Maximum response was obtained on medium containing BA 5,7 mM (65 %) with regard to BA 4,4 mM. The lowest percentages on shoot formation and the greatest callus formation (100 %) were obtained on medium containing IAA/BA 7,5/8,8 mM. The explant expansion response was observed in almost all treatments (75 to 100 %). However, BA concentration near to mM promoted shoot formation from cotyledon segments.

Key words: auxin, cytokinin, melon, Regeneration, tissue culture.

Introducción

La capacidad de regeneración de *C. melo* L (melón), utilizando diferentes explantes, muestra resultados pocos satisfactorios con respecto al porcentaje de regeneración. Según Moreno *et al.*(1985), el melón es capaz de sufrir morfogénesis vía organogénesis y vía embriogénesis, dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas y el tipo de explante. Ellos encontraron regeneración a partir de callos de melón cv. "Amarillo Oro" partiendo de explante de hipocotilo y cotiledón en un medio que contenía 1,5 mg/l de AIA y 6,0 mg/l de kinetina. Debaujon y Branchard (1992), obtuvieron respuestas utilizando protoplastos de melón que son aislados de cotiledones y hojas crecidas *in vitro*, en un medio con, 1 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de BA; caulogenésis en un medio con 0,5 mg/l de BA y 0,5 mg/l de kinetina. Punja *et al.*, (1990) obtuvieron regeneración embriogénica y organogénica. Lesherm, (1989), al considerar la polaridad de los explantes, optimizo la regeneración. Yadav *et al.*, (1996) utilizando explantes de hojas y algunos factores que influyen en la regeneración incluyendo condiciones de crecimiento (edad de la hoja, orientación del explante, agente gelatificante, adición de nitrato de planta y un herbicida (sulfonilurea), en el medio de cultivo, además, el medio de cultivo contiene 5 mM de AIA, 5 mM de BA, 1mM ABA, y 30 mM de nitrato de plata y 2,6 gr/l de FHYTAGEL); obtienen 10-100 brotes por explante. Otros reportes en cucurbitaceas han sido plublicados. Chee, (1990), trabajó con ***Cucumis pepo*** L. var. YC60, y encontró embriones somáticos a partir de callos. Bursza y Malepszy, (1995), obtuvieron embriones a partir de cultivo de protoplastos y cultivo de suspensiones embriogénicas de ***Cucumis sativus*** L, entre otros.

Sin embargo, en trabajos con cucurbitáceas la relación de fitohormonas añadidas al medio de cultivo juegan papeles determinantes para la regeneración (Chee, 1992 y Vielma, 1995). La regeneración de plantas es obviamente problemática y no eficiente en la mayoría de los casos citados. Se requieren eficientes procedimientos de regeneración ***in vitro*** para la obtención de plantas transgénicas expresando potencialmente el manejo de los genes.

Debido a estas circunstancias, se consideró perentorio optimizar los factores que afectan la regeneración de melón para obtener un eficiente sistema de obtención y propagación de plantas transformadas mediante ***A. tumefaciens***. Aplicando las técnicas de cultivo de tejido vegetales ***in vitro*** y mediante la bioestadística la cual es utilizada actualmente para resolver problemas en esta área, ya que se puede estimar una serie de respuestas mediante modelos propuestos por la estadística, disminuyendo el trabajo al azar y proporcionando rendimientos en cuanto al material. En esta investigación se aplicó el Diseño Compuesto Central Rotable (CCR), el cual determina una superficie de respuesta. La metodología para la superficie de respuesta es definida por Myer, (1971) (citado en Martínez, 1988) y nos permite obtener las relaciones de las fitohormonas ácido indol acético (AIA) y benciladenina (BA), que promuevan una respuesta y determinar su óptimo.

Materiales y Métodos

Medios de cultivo

Medio Básico Murashige y Skoog (MBMS) (1962). El pH final fue ajustado 5.7 +/- 1 previo a la esterilización. Como agente solidificante se utilizó agar al 0.8%.

Medio de Regeneración (MR), medio MBMS suplementado con diferentes concentraciones de fitohormonas AIA/BA (Tabla 1); medio de alargamiento (MA), medio MBMS más 0.05 mg/l de BA; medio de enraizamiento, medio MBMS más 20 mg/l de sacarosa.

Inducción de primordios de vástagos y regeneración

Los segmentos de cotiledón, fueron obtenidos por activación y crecimiento del eje embrionario a partir de semillas de melón variedad Edisto, (Quadrisem). Dichos explantes fueron cortados en los extremos distal y proximal aproximadamente 1-2 mm, el explante midio 1 cm. Fueron cultivados en cajas de Petri con medio de regeneración (MR) más cefotaxima (Cx) a 250 mg/l (para eliminar la bacteria endógena presente en el explante), más diferentes relaciones de AIA/BA (Tabla 1). El control se realizó

Tabla 1.
Respuestas morfogénicas y formación de callo de segmentos de cotiledón de melón var. Edisto en diferentes tratamientos de AIA/BA

Tratam.	AIA (mM)	BA (mM)	N° de P.V.	Explante con P.V. (%)	Presencia de callo (%)	Expansión del explante (%)	Contaminación del explante (%)	Total de explantes muertos (%)	Total de explantes evaluados (%)	Respuesta morfogénica
0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100
1	4,7	1,3	49	16,66	41,66	87,50	95,83	4,16	95,83	4,16
2	10,3	1,3	50	20,83	49,83	75,00	95,83	4,16	95,83	4,16
3	4,7	7,5	560	87,50	37,50	75,00	37,50	0	100	0
4	10,3	7,5	323	83,33	41,66	87,50	79,16	12,50	87,50	0
5	11,5	4,4	195	66,66	37,50	100	100	0	100	0
6	3,5	4,4	109	54,16	79,16	41,66	37,50	4,16	95,83	0
7	7,5	8,8	10	12,50	100	91,66	4,16	0	100	0
8	7,5	0,0	0	0	0	100	4,16	0	100	100
9	7,5	4,4	46	33,33	58,33	100	54,16	0	100	0

con medio MR más Cx a 250 mg/l, libre de reguladores de crecimiento. Después de 3-4 semanas los primordios de vástagos regenerados fueron cultivados en medio de alargamiento sólido (MA) de 3-4 semanas y en medio de alargamiento líquido (MA$_L$) de 3-4 semanas más, las yemas desarrolladas fueron subcultivadas en medio de enraizamiento (ME). Permanecieron de 3-4 semanas y posteriormente fueron aclimatizadas las plantas desarrolladas.

Condiciones de incubación

La incubación para cada paso de regeneración se realizó en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (Percival) a temperatura 25-26 ± 2 °C, intensidad lumínica de 1675 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Análisis y recolección de datos

Se realizó un análisis estadístico con el sotfware SAS (SAS Institute, 1988) mediante el Diseño CCR, para determinar la efectividad y las diferencias con respecto al control en cuanto a las relaciones de fitohormonas aplicadas a los explantes de melón en el medio de cultivo.

El número de repeticiones por cada tratamiento fue de tres (3) veces, para establecer un límite de confianza en las respuestas obtenidas. En cada cápsula de Petri fueron colocados ocho (8) explantes, totalizando 24 explantes lo que dio como resultado 240 explantes experimentados (tomando en cuenta el control). Cada explante fue evaluado semanalmente por un lapso de tres (3) meses, fueron registradas respuestas de formación de callo y morfogénicas.

Resultados

Inducción de primordios de vástagos y regeneración

Los resultados cuantificados son presentados en la Tabla 1. La mayoría de los explantes presentan vigorosidad y color verde para cada tratamiento, la totalidad de ellos presentaron poca contaminación bacteriana. Las respuestas de callo y organogénica fueron específicas para cada tratamiento (relaciones de fotohormonas AIA/BA), en 2-3 semanas. La formación de callo fue observada en los tratamientos 6 y 7 (Figura 1), con porcentajes de 76,16 y 100 %



Figura 3. Grupo de primordios de vástagos alargándose. Se aprecia diferenciación de hojas en MA_8



Figura 4. Yema alargada e individualizada a partir de primordios de vástagos en MA_7

Tabla 2.
Análisis de varianza para probar el efecto de las diferentes relaciones de AIA/BA sobre el porcentaje primordios de vástagos.

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias de cuadrados	F	Valor-P
Entre grupos	31361,4	9	3462,38	11,28	0,000
Dentro de Grupos	6140,4	20	307,02		
Total (Corr.)	37301,8	29			

Tabla 2a.
Análisis de regresión múltiple para respuesta de inducción de primordios de vástagos.

Parámetros	Estimado	Error Estandar	T	Valor-P
Constanteb	5,02	14,36	0,34	0,729
AIA	-51,64	33,44	-1,54	0,135
BA	117,96	29,67	3,97	0,000
AIA^2	29,40	18,50	1,58	0,125
BA^2	-34,41	13,48	-2,55	0,017
AIA/BA	-15,74	19,25	-0,81	0,421

Coeficiente de determinación(R^2): 58,1932 %

Discusión

Formación de callo y expansión del explante

En los ensayos realizados se presentó formación de callo debido a la presencia en el medio de cultivo de AIA/BA en forma proporcionada, es decir, cantidades donde la relación de fitohormonas no varían mucho(tratamientos 6 y 7), observándose el mayor porcentaje de respuesta. Cuando las concentraciones de AIA son mayores que las de BA, se forman raíces (tratamiento 1,2 y 8), lo que indica que es evidente en este sistema el papel que juegan



Figura 7. a) Explante de melon tratado con 1mg/l de BA, observándose clorótico y ninguna inducción de primordios de vástagos. b) Explante tratado con 1,3 mg/l de BA, observándose expansión del explante e inducción de primordios de vástagos.

Inducción y desarrollo de primordios de vástagos, se observó cuando la mayor concentración de BA estaba presente en el medio de cultivo (tratamiento 3), induciendo una notoria división celular y diferenciación mientras que a concentraciones altas de auxinas hubo poco desarrollo de primordios de vástagos (tratamientos 1, 2, 8 y 9). Se observó que concentraciones altas de auxinas y bajas de citoquinina, no produjeron una división y diferenciación celular del tejido, solo alargamiento, efecto que se produce cuando hay presencia de auxinas. Reportes similares fueron mostrados en manzana con citoquininas y auxinas (Yepes, 1994) y en diferentes cultivares de melón por Gonsalves, *et al.*, (1994). Cabe mencionar que sin presencia de BA no hay división celular, ni sustancias promotoras para inducir respuestas de diferenciación (Roca y Mroginski, 1991).

En los tratamientos 4 y 5 pudieran estar influyendo los niveles endógenos de BA presentes en el explante que contrarrestaran el efecto de AIA exógeno y por ello induce el desarrollo de primordios de vástagos. Se ha generalizado que citoquininas combinadas con las auxinas, estimulan la división celular en plantas, interactuando en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular (Hurtado y Merino, 1988). Sin embargo, a concentraciones mayores de 4,4 mM de BA se observa mayor y mejor desarrollo de primordios de vástagos.

Análisis de tratamientos

El análisis estadístico evalúa respuestas claras para la aplicación de concentraciones de BA que inducen la respuesta de inducción de primordios de vástagos y su maximización. Cada relación de AIA/BA aplicada posee características que determinan las respuestas, sin embargo existe una clara evidencia de que los primordios de vástagos se inducen y se desarrollan en presencia de BA, es decir, según el análisis estadístico por cada unidad de BA (mg/l) presente en el medio de cultivo se induce la formación de primordios de vástagos en un 100 %. Sin embargo, altas concentraciones de BA pueden producir malformaciones, que se pudieran evitar disminuyendo o eliminando la concentración de BA en el medio de alargamiento, y así el explante pueda adquirir un balance endógeno de fitohormonas.

Conclusiones

El establecimiento de un método de regeneración para plantas de *C. melo* L. var. **Edisto** es determinante para establecer un sistema óptimo de transformación genética mediado por *A. tumefaciens*, para la introducción de nueva información genética y así mejorar el sistema de cultivo en campo. Sin embargo, la optimización de ciertos métodos de propagación está determinado por ciertos factores que determinan la respuesta del explante en el medio de cultivo, uno de ellos es el estado fisiológico del explante. En el ensayo se determinó que la mayor inducción de primordios de vástagos esta determinada por la presencia de BA a concentraciones de 4,4 y 5,7mM. Además, aplicando como herramienta en los técnicas de cultivos *in vitro* la estadística (CCR), la cual nos determina una superficie de respuesta estimando concentraciones optimas en cuanto a la respuesta estudiada.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, por el financiamiento otorgado bajo el Código C-768-05-03-B y al Sr. Sócrates Pérez por el trabajo fotográfico.

Referencias bibliográficas

BURZA, W y S. MALEPSZY. 1995. In vitro Culture of *Cucumis sativus* L. XVIII. Plants from protoplast through direct somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 41: 259-266.

CHEE, P. 1990. High frecuency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. HortSc. 27: 237-239.

____. 1992.Initiation and maturation of somatic embryos of squash *Cucurbita pepo* L. HortSc. 27. 59-60.

DEBEAUJAN, y M. BRANCHARD. 1992. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplant-derived colonies of watermelon (*Cucumis melo* L.) Plant Cell Rpts. 37-40.

GONSALVES C, B. XUE, M. YEPES, M. FUCHS, K. LING, S. NAMBA, P. CHEE, J SLIGHTON y D. GONSALVES. 1994. Transfering cucumber and evaluation transgenic plant for production for protection against infection. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119 (2): 343-355.

HURTADO, V. y M. E. MERINO. 1988. Reguladores del crecimiento vegetal en: Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, Mexico, D.F. pp. 44-66.

LESHERM, B. 1989. Polarity and responsive regions for regenerations in the cultured melon cotyledon. J. Plant Physiol. 135:237-339.

MARTÍNEZ, A. 1988. Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Editorial Trillas. México. Pp. 329-404.

MORENO V, GARCÍA SOGO, I. GRANELL y B. GARCÍA SOGO.1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L cv. "Amarillo Oro"). Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 5: 139-146.

MURASHIGE T. y F. SHOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and Bio assays with Tabacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497.

PUNJA, Z. K., N. ABBAS, G. G. SARMIENTO y F. A. TANG. 1990. Regeneration of *Cucumis sativus* var. sativus, *C. sativus* var. Hardwickii. *C. melo*, and *C. metuliferos* from explants through somatic embryogenesis and orgnogenesis. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 21: 993-1022.

SAS INSTITUTE INC.1988. SAS/STAT™ User'sGuide, Release 6.03 edition. Cary, N.C: SAS Inst. Inc.

TALÓN, M. y B. AZCÓN. 1993. Fisiología y Bioquímica vegetal. Editorial McGraw-Hill Interamerica. España. pp.285-300.

VIELMA, M. 1995. Estudios de regeneración y transformación genética en *Cucumis melo* L. Obtención de plantas resistentes al virus del mosaico de la auyama (SqMV). Trabajo de ascenso. ULA: Fac. de Ciencias. Mérida, Venezuela. pp.84.

YADAV, R., T. MOHAMED y R. GRUMET. 1996. High frecuency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 45: 207-214.

YEPES, M. y H. ALDWINCKLE. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apples, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 37: 257-259.